

## · 实验研究 ·

# 白藜芦醇对高糖环境下视网膜细胞凋亡的抑制作用

李青春<sup>1</sup> 李岱<sup>1</sup> 邢怡桥<sup>2</sup><sup>1</sup>湖北科技学院眼科教研室, 咸宁 437100; <sup>2</sup>武汉大学人民医院眼科中心, 武汉 430060

通信作者: 邢怡桥, Email: xingyiqiao@gmail.com

**【摘要】** 目的 观察白藜芦醇(Res)对链脲佐菌素诱发的糖尿病大鼠视网膜神经节细胞(RGCs)及高糖状态视网膜色素上皮(RPE)细胞凋亡的影响。方法 取 25 只 SD 大鼠腹腔注射链脲佐菌素制作糖尿病模型,确定造模成功 20 只,按照随机数字表法将模型鼠分为糖尿病模型组和 Res 灌胃组,另选取 10 只大鼠作为正常对照组。Res 灌胃组大鼠用 Res 40 mg/(kg·d)灌胃给药,正常对照组和糖尿病模型组大鼠用等容量生理盐水灌胃,分别于灌胃后当日(0 周)、4、8、12 周测定大鼠体质量和经尾尖静脉采血测定血糖浓度,连续给药 12 周时处死大鼠并取双眼眼球,透射电子显微镜下观察各组大鼠 RGCs 超微结构变化;采用 TUNEL 法检测 RGCs 凋亡情况并计算凋亡指数。将 ARPE-19 细胞株分为正常对照组、高糖组及 Res 处理组,分别用含 5.5 mmol/L 葡萄糖、30 mmol/L 葡萄糖和 30 mmol/L 葡萄糖+10 μmol/L Res 的培养基培养 48 h,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率;采用免疫荧光法及 Western blot 法检测细胞中 bax 和 bcl-2 蛋白表达。结果 给药 4、8、12 周时,Res 灌胃组大鼠体质量均高于相应时间点糖尿病模型组(均  $P < 0.01$ ),给药后 8、12 周时,Res 灌胃组糖浓度均低于相应时间点糖尿病模型组(均  $P < 0.01$ )。透射电子显微镜下可见糖尿病模型组 RGCs 核染色质凝聚,线粒体肿胀及细胞质空泡化;Res 灌胃组 RGCs 超微结构变化明显轻于糖尿病模型组。Res 灌胃组 RGCs 层和视网膜内核层细胞凋亡指数分别为(18.36±3.37)%和(23.67±8.98)%,分别低于糖尿病模型组的(83.91±9.8)%和(64.26±10.66)%,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。正常对照组、高糖组、Res 处理组 ARPE-19 细胞凋亡率分别为(3.11±0.26)%、(11.41±1.06)%和(5.38±0.58)%,Res 处理组细胞凋亡率明显低于高糖组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。高糖组细胞核中 bax 蛋白荧光明显增强,bcl-2 蛋白荧光强度明显减弱;Res 处理组细胞核 bax 蛋白荧光强于正常对照组,但弱于高糖组,Res 处理组 bcl-2 蛋白荧光弱于正常对照组,但强于高糖组。Western blot 法检测正常对照组、高糖组和 Res 处理组 bax 蛋白相对表达量分别为 0.15±0.06、0.31±0.09 和 0.21±0.08,bcl-2 蛋白相对表达量分别为 0.80±0.14、0.23±0.09、0.66±0.25;高糖组 bax 蛋白相对表达量明显高于正常对照组和 Res 处理组,bcl-2 蛋白相对表达量明显低于正常对照组和 Res 处理组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ );Res 处理组 bcl-2/bax 值明显高于高糖组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 Res 可抑制糖尿病大鼠 RGCs 以及高糖环境下 RPE 细胞的凋亡。

**【关键词】** 白藜芦醇; 视网膜神经节细胞; 视网膜色素上皮细胞; 凋亡; 凋亡相关蛋白**基金项目:** 湖北省教育厅基金资助项目(B2015074); 湖北科技学院博士启动基金项目(2018-20XB013)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200519-00351

## Inhibitory effects of resveratrol on high glucose-induced apoptosis of retinal cells

Li Qingchun<sup>1</sup>, Li Dai<sup>1</sup>, Xing Yiqiao<sup>2</sup><sup>1</sup>Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China; <sup>2</sup>Ophthalmological Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: Xing Yiqiao, Email: xingyiqiao@gmail.com

**[Abstract]** **Objective** To investigate the inhibitory effects of resveratrol (Res) on the apoptosis of retinal neurons of diabetic rats and ARPE-19 cells induced by high glucose. **Methods** Streptozotocin was intraperitoneally injected to establish a diabetes model in 25 adult male SD rats, and 20 successful models were randomized into diabetic model group and Res-administered group according to random number table method. Another 10 matched normal rats were served as normal control group. Res was intragastrically given to the rats in the Res-administered group with the dose of 40 mg/(kg·d), and an equivalent volume of normal saline solution was used in the same way in the diabetic model group and normal control group. The body weight and blood glucose level were measured on the

0th, 4th, 8th, 12th week of administration. The rats were sacrificed on the 12th week by over-anesthesia and the eyeballs were enucleated. The ultrastructure of the retinal ganglion cells (RGCs) were examined under the transmission electron microscope. The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) assay was to assess the apoptosis of retinal neurons. ARPE-19 cells were divided into normal control group, high glucose group and Res-treated group and cultured for 48 hours in medium containing 5.5 mmol/L glucose, 30 mmol/L glucose, 30 mmol/L glucose and 10 mol/L Res, respectively. Apoptosis rate was detected by a flow cytometry. The distribution and expression of bax and bcl-2 in the cells was detected by immunofluorescence and Western blot assay, respectively. This study protocol was approved by an Experimental Animal Ethic Committee of Hubei University of Science and Technology, and the use and care of the animals complied with the Statement of ARVO. **Results** Compared with the diabetic model group, the body weight was increased at 4–12 weeks and the blood glucose level was lowered at 8–12 weeks of Res administration in the Res-administered group (both at  $P < 0.01$ ). The chromatin condensation, mitochondrial swelling and vacuolation in cytoplasm were obviously slight and the apoptosis rate was reduced in the Res-administered group in comparison with the diabetic model group. The apoptosis indexes of the retinal ganglion cell layer cells and inner nuclear layer cells in the Res-administered group were  $(18.36 \pm 3.37)\%$  and  $(23.67 \pm 8.98)\%$ , respectively, which were significantly lower than  $(83.91 \pm 9.8)\%$  and  $(64.26 \pm 10.66)\%$  in the diabetic model group (both at  $P < 0.01$ ). The apoptosis rate of the ARPE-19 cells in the normal control group, high glucose group and Res-treated group was  $(3.11 \pm 0.26)\%$ ,  $(11.41 \pm 1.06)\%$  and  $(5.38 \pm 0.58)\%$ , respectively, and the apoptosis rate in the Res-treated group was significantly lower than that in the high glucose group (all at  $P < 0.01$ ). Immunofluorescence assay showed that the fluorescence of bax in the cell nucleus of Res-treated group was obviously enhanced in comparison with the normal control group and weaker in comparison with the high glucose group. The fluorescence of bcl-2 protein in the Res-interfered group was weaker in comparison with the normal control group and enhanced in comparison with the high glucose group. The relative expressions level of bax protein in the Res-treated group was  $0.21 \pm 0.08$ , which was significantly higher than  $0.15 \pm 0.06$  in the normal control group and lower than  $0.31 \pm 0.09$  in the high glucose group (both at  $P < 0.05$ ). The relative expressions of bcl-2 protein was  $0.66 \pm 0.25$  in the Res-treated group, which was significantly lower than  $0.80 \pm 0.14$  in the normal control group and higher than  $0.23 \pm 0.09$  in the high glucose group (both at  $P < 0.05$ ). The bcl-2/bax ratio in the Res-treated group was significantly higher than that in the high glucose group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Res can inhibit the apoptosis of RGCs of diabetic rats and high glucose-induced RPE cells *in vitro*.

[**Key words**] Resveratrol; Retinal ganglion cells; Retinal pigment epithelial cells; Apoptosis; Apoptotic related protein

**Fund program:** Hubei Provincial Department of Education Program (B2015074); Ph. D. Startup Fund Project of Hubei University of Science and Technology (2018-20XB013)

DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200519-00351

糖尿病发病率呈逐年上升趋势,至 2014 年全球患病人数已达 4.22 亿<sup>[1]</sup>。糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病的主要并发症之一,不仅危害患者视力,也降低患者生活质量。研究表明视网膜神经节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)凋亡是 DR 早期发病的重要特征<sup>[2]</sup>,早期干预 RGCs 的凋亡可以延缓 DR 的发生和发展<sup>[3]</sup>;视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)细胞的主要功能是转运葡萄糖,为 RGCs 代谢提供能量<sup>[4]</sup>。近年来研究证实白藜芦醇(resveratrol, Res)可对高血糖环境下 RGCs 和 RPE 细胞的损伤和/或死亡发挥保护作用<sup>[5-6]</sup>,但其作用机制尚未完全阐明。为了探讨 Res 保护 RGCs 及 RPE 的作用机制,本研究观察 Res 对糖尿病大鼠 RGCs 及高糖环境下 RPE 凋亡的抑制作用,以期对 DR 的早期防治提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及细胞** 选用 SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只,由湖北科技学院动物实验中心[许可证号:SYXK(鄂)2013-0071]提供,平均体质量( $250 \pm 10$ )g,本研究获湖北科技学院动物伦理委员会批准。实验动物饲养和使用均遵循 ARVO 相关实验动物伦理学声明。人 RPE 细胞株 ARPE-19 由中山眼科中心惠赠。

**1.1.2 主要试剂及仪器** RIPA 裂解液、链脲佐菌素、白藜芦醇、DMSO(美国 sigma 公司);细胞凋亡检测试剂盒(美国 Roche 公司);bcl-2、bax 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔(SA00001-2, 1:5 000)(美国 Proteintech 公司);荧光标记 JC-1 试剂盒(KGA604,

南京凯基生物技术公司);病理切片机(RM2016)(上海徕卡仪器有限公司);带摄像系统光学显微镜(Olympus BX50)、透射电子显微镜(TEM H-600)(日本日立公司);荧光倒置显微镜(日本尼康公司);流式细胞仪(美国 BD 公司),电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 糖尿病模型建立** 取 25 只大鼠,禁食 24 h 后腹腔内注射 25 mg/(kg·d)链脲佐菌素,注射 30 min 后恢复进食,次日采集尾静脉血测定血糖浓度,对血糖浓度低于 14 mmol/L 的大鼠行二次注射,如二次注射后血糖浓度均低于 16.7 mmol/L 则剔除,最终确定造模成功共 20 只。按照随机数字表法将模型鼠分为糖尿病模型组和 Res 灌胃组,每组 10 只;另选取 10 只匹配的大鼠作为正常对照组,腹腔注射等量枸橼酸缓冲液。参照前期研究<sup>[7]</sup>所用白藜芦醇浓度,Res 灌胃组 40 mg/(kg·d)白藜芦醇连续灌胃 12 周,每日 1 次;正常对照组和糖尿病模型组给予等容量生理盐水灌胃。分别于灌胃给药的当日(第 0 周)、第 4、8、12 周时测定大鼠的体质量和血糖浓度。

**1.2.2 透射电子显微镜观察各组大鼠视网膜超微结构** 于灌胃 12 周时,采用过量水合氯醛注射法处死大鼠,各组取大鼠右侧眼球 10 个,生理盐水清洗干净后置于体积分数 2.5%戊二醛中固定 1 周。沿赤道部切开眼球,取视盘附近 2 mm 处视网膜组织(2 mm×3 mm),置于 2.5%戊二醛中固定 2 h,用二甲酸钠缓冲液冲洗后浸入质量分数 1%锇酸中固定 2 h。固定的组织块用双蒸水冲洗,依次用梯度乙醇溶液脱水,环氧树脂包埋,做 1 μm 超薄切片,行天青-美兰染色,光学显微镜下定位。将定位好的标本行 50~60 nm 厚超薄切片,行醋酸双氧铀/枸橼酸铅染色,透射电子显微镜下观察 RGCs 的超微结构并拍照。

**1.2.3 TUNEL 法检测各组大鼠 RGCs 凋亡** 快速取各组大鼠左眼球,生理盐水清洗,置于体积分数 10%甲醛溶液中固定 1 h,沿角巩膜缘向眼球内注入少量固定液,继续固定 24 h。固定的眼球依次用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,60℃恒温箱中浸蜡,石蜡包埋,室温冷却。沿眼球纵切面行 5 μm 厚连续切片,选取包含视网膜的切片,置入 45~48℃温水中,用涂有多聚赖氨酸防脱玻片捞片,行常规苏木素-伊红染色。每个眼球随机取 5 张切片,每张切片连续取 5 个视野(×400)光学显微镜下观察并拍照。细胞核呈棕黄色

染色者记为 TUNEL 阳性细胞。凋亡指数 = 各层阳性细胞数/各层总神经细胞数×100%。

### 1.2.4 流式细胞术测定各组 ARPE-19 细胞凋亡率

将 ARPE-19 细胞接种至含 10%胎牛血清、100 U/ml(商品单位)青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,分为正常对照组、高糖组和 Res 处理组,分别用含 5.5 mmol/L 葡萄糖、30 mmol/L 葡萄糖和 30 mmol/L 葡萄糖+10 μmol/L Res 的培养基进行培养。培养 48 h,用胰蛋白酶消化细胞,将细胞转移至 EP 管中,1 200 r/min 离心 6 min,弃培养基,用凋亡孵育缓冲液重悬细胞,离心弃去缓冲液,加入凋亡双标染色溶液 100 μl 重悬细胞,室温下避光孵育 15 min 以上,离心弃去染色溶液,加入荧光组分,4℃条件下孵育 30 min,离心弃去荧光组分,PBS 缓冲液重悬细胞,流式细胞仪上机测定各组细胞凋亡率。

### 1.2.5 免疫荧光法检测各组细胞中 bcl-2、bax 蛋白表达

取培养的细胞按照 1.2.4 中的方法进行分组培养 48 h,收集对数生长期细胞,将质量分数 0.25%胰蛋白酶加入培养基,制备单细胞悬液。于超净工作台内将细胞悬液滴加至含有载玻片的六孔板中,置于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2 h,补充细胞培养基继续培养 6 h。用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。于 4%多聚甲醛中固定 30 min,PBS 冲洗,加入破膜工作液,室温孵育 15 min;PBS 冲洗,滴加 bcl-2 或 bax 一抗(均 1:500),4℃孵育过夜,PBS 冲洗,滴加相应二抗,避光室温下孵育 50 min,PBS 冲洗,滴加 DAPI 染液复染细胞核,抗荧光猝灭剂封片,荧光倒置显微镜下观察并拍照。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件将荧光照片转换为黑白图片,选取相同的黑色作为判断阳性的统一标准,分析每张照片中阳性累积吸光度值(A 值)。

### 1.2.6 Western blot 法检测各组细胞中 bcl-2、bax 蛋白的表达

收集各组培养细胞,PBS 冲洗干净,加入适当体积的 RIPA 裂解液,充分裂解细胞,离心收集上清,即为总蛋白溶液。采用 Western blot 试剂盒进行蛋白定量,BCA 法测定蛋白质量浓度;配制质量分数 5%的浓缩胶进行电泳,浓缩胶电压 75 V,分离胶用 120 V 电泳;300 mA 恒流转膜 30 min;将转好的 PVDF 膜用质量分数 5%的脱脂牛奶封闭 1 h。分别滴加 bcl-2 和 bax 一抗(均 1:500),4℃孵育过夜,TBST 冲洗;置于 HRP 标记山羊抗兔二抗(1:3 000),室温下孵育 30 min,TBST 冲洗;化学发光法显色,行凝胶图像分析,用 PhotoShop 软件进行整理去色等处理,Alpha 软件分析目标蛋白的吸光度值(A 值),以 β-actin 为内参照,计算各目的蛋白的相对表达量。



### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 法检验证实呈正态分布,以 mean±SD 表示。采用均衡分组单因素干预多水平研究设计,各组间计量资料总体差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠体质量比较

与给药 0 周时比较,给药 4、8、12 周时糖尿病模型组大鼠体质量无明显增加,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),给药 4、8、12 周时糖尿病模型组大鼠体质量均明显低于相应时间点正常对照组和 Res 灌胃组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 1)。

**表 1 各组大鼠不同时间点体质量变化比较 (mean±SD, g)**  
**Table 1 Comparison of body weight at various time points among the three groups (mean±SD, g)**

组别	样本量	给药不同时间点体质量			
		0 周	4 周	8 周	12 周
正常对照组	10	250.81±4.69	341.32±6.97 <sup>ab</sup>	437.64±8.62 <sup>ab</sup>	524.94±10.52 <sup>ab</sup>
糖尿病模型组	10	251.70±4.63	253.23±4.88	254.57±4.45	265.42±5.36
Res 灌胃组	10	249.95±4.31	297.44±5.28 <sup>ab</sup>	356.54±6.24 <sup>ab</sup>	425.56±7.45 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值		0.547	465.778	1 598.457	2 505.681
<i>P</i> 值		>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

注:与各自给药 0 周比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与各自糖尿病模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Res:白藜芦醇

Note:Compared with respective 0 week after administration,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;compared with respective diabetic model group,<sup>b</sup> $P < 0.01$  (one-way ANOVA, LSD-*t* test) Res:resveratrol

### 2.2 各组大鼠不同时间点血糖浓度变化比较

各时间点糖尿病模型组和 Res 灌胃组大鼠血糖浓度均明显高于相应时间点正常对照组,差异有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。给药第 4 周时 Res 灌胃组大鼠血糖浓度即出现下降,但与相应时间点糖尿病模型组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );给药第 8 和 12 周 Res 灌胃组大鼠血糖浓度均明显低于相应时间点糖尿病模型组,差异有统计学意义(均  $P < 0.01$ )(表 2)。

**表 2 各组大鼠不同时间点血糖浓度比较 (mean±SD, mmol/L)**  
**Table 2 Comparison of blood glucose levels at various time points among the three groups (mean±SD, mmol/L)**

组别	样本量	给药不同时间点血糖浓度			
		0 周	4 周	8 周	12 周
正常对照组	10	5.79±0.23	5.95±0.43	6.41±0.48	6.11±0.36
糖尿病模型组	10	24.43±2.88 <sup>a</sup>	23.62±2.76 <sup>a</sup>	25.29±2.55 <sup>a</sup>	24.42±2.87 <sup>a</sup>
Res 灌胃组	10	24.08±3.31 <sup>a</sup>	20.71±2.31 <sup>a</sup>	15.54±1.94 <sup>ab</sup>	10.25±1.36 <sup>ab</sup>
<i>F</i> 值		2 378.664	1 105.454	3 641.618	1 854.867
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与各自时间点正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与各自时间点糖尿病模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ (单因素方差分析,LSD-*t* 检验) Res:白藜芦醇

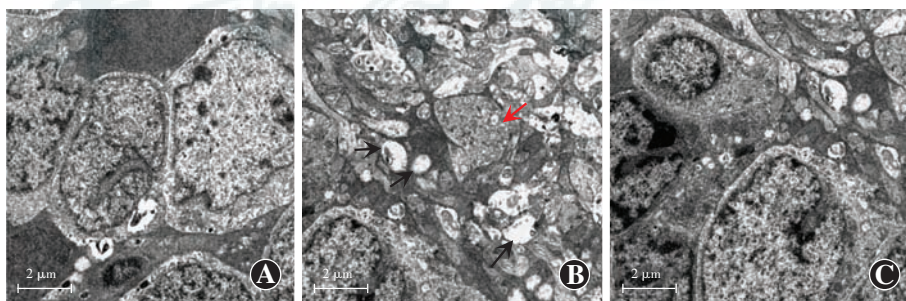
Note:Compared with the respective normal control group,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;compared with the respective diabetic model group,<sup>b</sup> $P < 0.01$  (one-way ANOVA, LSD-*t* test) Res:resveratrol

### 2.3 各组大鼠 RGCs 超微结构变化比较

透射电子显微镜下可见正常对照组大鼠 RGCs 细胞膜结构完整,边缘清晰无明显增厚,线粒体、细胞核等结构均未见异常;糖尿病模型组 RGCs 细胞核膜较多皱缩,局部厚薄不均,细胞核多呈不规则形,线粒体肿胀明显,嵴大部分丢失,染色质多位于细胞核边缘呈现凝聚状态,细胞质内较多空泡样变;Res 灌胃组 RGCs 上述结构改变均较糖尿病模型组减轻(图 1)。

### 2.4 各组大鼠 RGCs 凋亡情况比较

正常对照组大鼠视网膜组织中少见 TUNEL 阳性细胞;糖尿病模型组大鼠视网膜组织中可见大量 TUNEL 阳性细胞,主要位于 RGC 层和内核层;Res 灌胃组大鼠视网膜组织中 TUNEL 阳性细胞少于糖尿病模型组(图 2A~

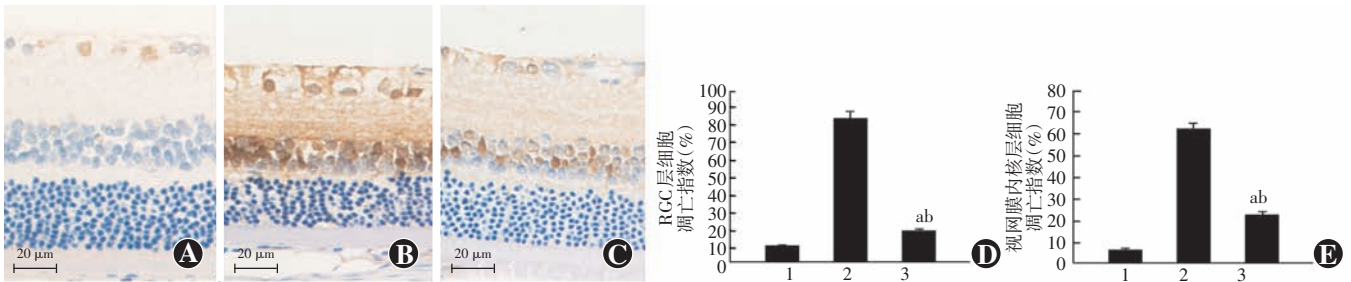


**图 1 各组大鼠 RGCs 透射电子显微镜图(×10 000, 标尺=2 μm)** A:正常对照组大鼠 RGCs 超微结构均未见异常 B:糖尿病模型组细胞核膜呈现较多皱缩,局部厚薄不均,细胞核多呈不规则形,线粒体肿胀明显,染色质边缘聚集(红色箭头),细胞质中出现较多空泡(黑色箭头) C:Res 灌胃组 RGCs 细胞超微结构改变均较糖尿病模型组减轻。

**Figure 1 Transmission electron microscopy of RGCs in each group (×10 000, scale bar=2 μm)** A:In the control group,the RGCs had uniformly normal-appearing nuclei and mitochondria B:In the diabetic model group, swelling of mitochondria, loss of cristae, chromatin margination, chromatin condensation(red arrow) and vacuolation (black arrow) were seen C:The ultrastructural changes of RGCs in the Res-administered group were slighter than those in the diabetic model group

C)。糖尿病模型组 RGC 层和内核层细胞凋亡指数分别为  $(83.91 \pm 9.8)\%$  和  $(64.26 \pm 10.66)\%$ , 明显高于正常对照组的  $(9.43 \pm 1.62)\%$  和  $(6.77 \pm$

$1.13)\%$  及 Res 灌胃组的  $(18.36 \pm 3.37)\%$  和  $(23.67 \pm 8.98)\%$ , 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 2D, E)。



**图 2 各组大鼠 RGC 层和内核层细胞凋亡情况比较** A: 正常对照组大鼠视网膜组织中 TUNEL 阳性细胞较少见 (DAB × 400, 标尺 = 20 μm) B: 糖尿病模型组 RGC 层和内核层中可见大量 TUNEL 阳性细胞 (DAB × 400, 标尺 = 20 μm) C: Res 灌胃组视网膜组织中 TUNEL 阳性细胞较糖尿病模型组少 (DAB × 400, 标尺 = 20 μm) D: 各组大鼠 RGC 层凋亡指数量化比较  $F = 1\ 234.454, P < 0.01$ 。与正常对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与糖尿病模型组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 10$ ) E: 视网膜内核层细胞凋亡指数比较  $F = 987.572, P < 0.01$ 。与正常对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与糖尿病模型组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 10$ ) 1: 正常对照组; 2: 糖尿病模型组; 3: Res 灌胃组 RGC: 视网膜神经节细胞

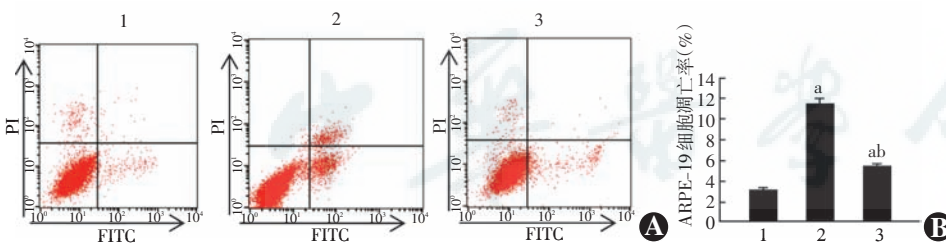
**Figure 2 Comparison of apoptosis of RGC layer and inner nuclear layer in each group** A: Only a few TUNEL-positive cells was observed in the RGC layer and inner nuclear layer of the normal control group (DAB × 400, scale bar = 50 μm) B: Many TUNEL-positive cells were distributed mainly in the RGC layer and the inner nuclear layer of the retinas in diabetic model group (DAB × 400, scale bar = 50 μm) C: TUNEL-positive cells were less in the RGC layer and inner nuclear layer of Res-treated group D: Comparison of apoptosis index of RGC layer among the three groups  $F = 1\ 234.454, P < 0.01$ . Compared with the normal control group,  $^a P < 0.01$ ; compared with the diabetic model group,  $^b P < 0.01$  (ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 10$ ) E: Comparison of apoptosis index of the inner nuclear layer among the three groups  $F = 987.572, P < 0.01$ . Compared with the normal control group,  $^a P < 0.01$ ; compared with the diabetic model group,  $^b P < 0.01$  (ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 10$ ) 1: normal control group; 2: diabetic model group; 3: Res-administered group RGC: retinal ganglion cell

### 2.5 各组 ARPE-19 细胞凋亡情况比较

正常对照组、高糖组和 Res 处理组细胞凋亡率分别为  $(3.11 \pm 0.26)\%$ 、 $(11.41 \pm 1.06)\%$  和  $(5.38 \pm 0.58)\%$ , 总体比较差异有统计学意义 ( $F = 891.32, P < 0.01$ )。高糖组细胞凋亡率明显高于正常对照组和 Res 处理组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 3)。

强于高糖组 (图 4)。

Western blot 检测结果显示, 正常对照组细胞 bcl-2 表达条带较强, bax 蛋白表达条带较弱; 高糖组 bcl-2 表达条带减弱, bax 蛋白表达条带增强, Res 处理组 bcl-2 表达条带强于高糖组, 而 bax 表达条带弱于高糖组 (图 5A)。正常对照组、高糖组和 Res 处理组 bax 蛋白相对表达量分别为  $0.15 \pm 0.06$ 、 $0.31 \pm 0.09$  和  $0.21 \pm 0.08$ , bcl-2 蛋白相对表达量分别为  $0.80 \pm 0.14$ 、 $0.23 \pm 0.09$  和  $0.66 \pm 0.25$ , 组间总体比较差异均有统计学意义 (bax:  $F = 2\ 341.32, P < 0.01$ ; bcl-2:  $F = 1\ 854.544, P < 0.01$ )。高糖组 bax 蛋白相对表达量明显高于正常对照组和 Res 处理组, bcl-2 蛋白相对表达量明显低于正常对照组和 Res 处理组;



**图 3 各组 ARPE-19 细胞凋亡情况比较** A: 各组细胞流式细胞图 B: 各组细胞凋亡率比较  $F = 891.32, P < 0.01$ 。与正常对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与高糖组比较,  $^b P < 0.01$  (单因素方差分析, LSD-*t* 检验,  $n = 3$ ) 1: 正常对照组; 2: 高糖组; 3: Res 处理组

**Figure 3 Comparison of apoptosis of ARPE-19 cells among the three groups** A: Flow cytometry result of each group B: Comparison of the apoptosis rate of different groups  $F = 891.32, P < 0.01$ . Compared with the normal control group,  $^a P < 0.01$ ; compared with the high glucose group,  $^b P < 0.01$  (ANOVA, LSD-*t* test,  $n = 3$ ) 1: normal control group; 2: high glucose group; 3: Res-treated group

### 2.6 各组 ARPE-19 细胞中 bax 和 bcl-2 蛋白的表达

免疫荧光染色结果显示, 高糖组细胞核 bax 蛋白荧光明显增强, bcl-2 蛋白荧光明显减弱; Res 处理组细胞核中 bax 蛋白荧光较正常对照组增强, 但弱于高糖组, Res 处理组 bcl-2 蛋白荧光较正常对照组减弱, 但

各组比较差异均有统计学意义 (均  $P < 0.01$ ) (图 5B)。各组 bcl-2/bax 值总体比较差异有统计学意义 ( $F = 1\ 254.245, P < 0.01$ ); 其中 Res 处理组 bcl-2/bax 值为  $3.14 \pm 1.02$ , 明显高于高糖组的  $0.74 \pm 0.31$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 5C)。



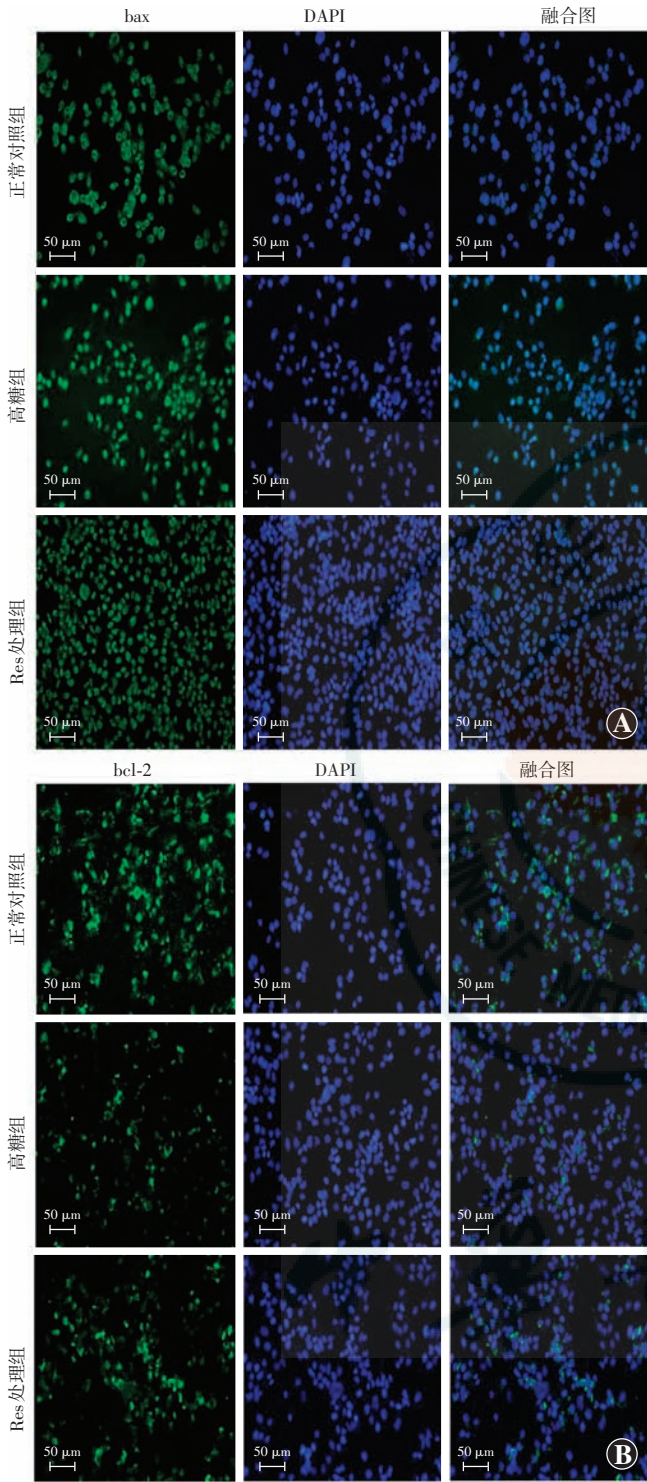


图 4 各组 ARPE-19 细胞中 bax, bcl-2 表达分布 (FITC ×400, 标尺 = 50 μm) A: 各组 bax 蛋白表达免疫荧光图 高糖组细胞核 bax 蛋白荧光明显增强, Res 处理组细胞核 bax 蛋白荧光较正常对照组增强, 但弱于高糖组 B: 各组 bcl-2 蛋白表达免疫荧光图 高糖组细胞核 bcl-2 蛋白荧光明显减弱, Res 处理组细胞核 bcl-2 蛋白荧光较正常对照组减弱, 但强于高糖组

**Figure 4** The expression of bax and bcl-2 in ARPE-19 cells of various groups (FITC ×400, scale bar = 50 μm) A: Immunofluorescence staining of bax in ARPE-19 cells of various groups The fluorescence of bax protein in the cell nucleus of the high glucose group was obviously enhanced, and that of the Res-treated group was enhanced in comparison with the normal control group, but weakened in comparison with the high glucose group B: Immunofluorescence staining of bcl-2 The fluorescence of bcl-2 protein in the cell nucleus of the high glucose group was obviously weakened, and that of the Res-treated group was weakened in comparison with the normal control group, but was enhanced in comparison with the high glucose group

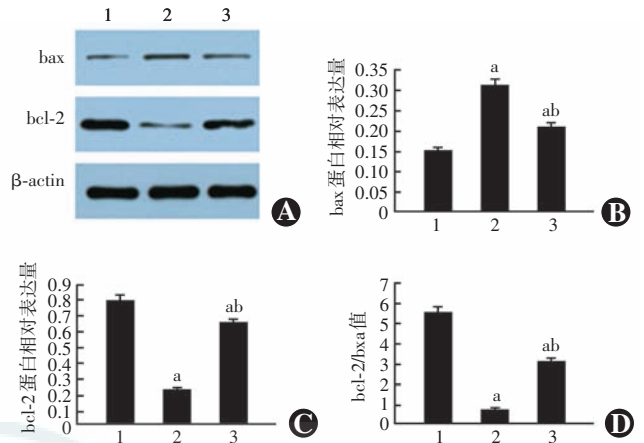


图 5 各组细胞 bax 和 bcl-2 蛋白相对表达量比较 A: 各组 bax 和 bcl-2 蛋白表达电泳图 B: 各组细胞 bax 蛋白相对表达量比较  $F = 2341.32, P < 0.01$ 。与正常对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与高糖组比较,  $^b P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) C: 各组细胞 bcl-2 蛋白相对表达量比较  $F = 1854.544, P < 0.01$ 。与正常对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与高糖组比较,  $^b P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) D: 各组细胞 bcl-2/bax 值比较  $F = 1254.245, P < 0.01$ 。与正常对照组比较,  $^a P < 0.01$ ; 与高糖组比较,  $^b P < 0.05$  (单因素方差分析, LSD- $t$  检验,  $n = 3$ ) 1: 正常对照组; 2: 高糖组; 3: Res 处理组

**Figure 5** Comparison of the relative expression of bax and bcl-2 protein among different groups A: The electrophoretogram of bax and bcl-2 protein in each group B: Comparison of bax protein expression among different groups  $F = 2341.32, P < 0.01$ . Compared with the normal control group,  $^a P < 0.01$ ; compared with the high glucose group,  $^b P < 0.05$  (ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 3$ ) C: Comparison of bcl-2 protein expression among different groups  $F = 1854.544, P < 0.01$ . Compared with the normal control group,  $^a P < 0.01$ ; compared with the high glucose group,  $^b P < 0.05$  (ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 3$ ) D: Comparison of bcl-2/bax ratio among different groups  $F = 1254.245, P < 0.01$ . Compared with the normal control group,  $^a P < 0.01$ ; compared with the high glucose group,  $^b P < 0.05$  (ANOVA, LSD- $t$  test,  $n = 3$ ) 1: normal control group; 2: high glucose group; 3: Res-treated group

### 3 讨论

研究表明, DR 发病初期即出现 RGCs 的凋亡, 对视功能造成不可逆损伤<sup>[8-9]</sup>。RGC 层和内核层细胞对高糖环境耐受较差, 且能表达大量凋亡相关因子<sup>[10-11]</sup>。RPE 细胞位于 RPE 层和脉络膜之间, 具有转运葡萄糖的功能, 可为 RGCs 代谢提供能量支持<sup>[4]</sup>。RPE 细胞长期处于慢性高糖环境下导致细胞形态及活力发生变化, 影响视网膜外屏障功能<sup>[12]</sup>。同时, RPE 的凋亡可影响葡萄糖的转运, 进而引起 RGCs 的能量供应减少, 加速 RGCs 的凋亡<sup>[13]</sup>。RPE 细胞也可调节多种细胞因子的表达, 参与 DR 的发生和发展<sup>[1-4]</sup>。为此, 探寻早期防止各种视网膜细胞损伤和凋亡的新型药物已成为 DR 的研究热点。

Res 是一种天然植物活性多酚, 对年龄相关性黄斑变性、DR 和青光眼等都有一定的防治作用, 但其是

否对视网膜细胞的凋亡产生防护作用目前尚不十分清楚。本研究观察 Res 对糖尿病模型大鼠 RGCs 和高糖环境下 RPE 细胞凋亡的影响可为 Res 对 DR 的早期防治提供实验依据。

本研究发现, Res 灌胃给药后糖尿病大鼠体质量和血糖趋于正常, RGCs 细胞超微结构改变均较糖尿病模型组轻, 且 RGC 层和内核层 TUNEL 阳性细胞减少, 细胞凋亡指数降低。而前期研究已证实 Res 可抑制视糖尿病大鼠视网膜变薄<sup>[7]</sup>, 说明 Res 能够减轻实验动物 RGCs 的病理损伤和凋亡, 保护神经细胞结构和功能的完整性。

研究证实, 30 mmol/L 的葡萄糖可对 ARPE-19 细胞造成损伤, 且呈时间依赖性, 并提示 ARPE-19 细胞培养 48 h 时细胞活性最佳<sup>[15]</sup>。本研究依据上述研究结果设定高糖浓度和细胞培养时间, 并参照前期研究选择 Res 药物浓度, 发现 Res 能明显降低高糖环境下 ARPE-19 细胞的凋亡率, 提示 Res 可减轻高糖诱导的 RPE 细胞的凋亡。

各种凋亡相关蛋白参与调控细胞凋亡, 其中 bcl-2 基因家族是重要的细胞凋亡调控基因。bcl-2 和 bax 因处于凋亡调控机制的终末端, 在维持细胞数量的动态平衡和生理性发育分化方面具有关键作用<sup>[16]</sup>, bcl-2 蛋白表达上调或 bax 蛋白表达下调及 bcl-2/bax 值增加则抑制细胞凋亡, 反之则加速细胞凋亡<sup>[17]</sup>。本课题组前期研究已证实 Res 能通过上调 bcl-2 的表达及下调 bax 的表达来抑制糖尿病大鼠 RGCs 凋亡<sup>[7]</sup>。本研究结果显示, Res 处理组 ARPE-19 细胞中 bcl-2 的表达增多而 bax 蛋白表达减少, bcl-2/bax 值较高糖组增大, 提示 Res 可对高糖诱导的 ARPE-19 细胞发挥抗凋亡作用。

Res 可抑制糖尿病大鼠 RGCs 凋亡, 减少高糖环境下 RPE 细胞凋亡, 其 Res 对视网膜的保护作用并不局限于抗凋亡作用, 后续的研究将进一步探索 Res 对视网膜的其他保护途径。

利益冲突 所有作者均声明不存在任何利益冲突

## 参考文献

[1] NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants [J]. *Lancet*, 2016, 387 (10027) : 1513-1530. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00618-8.

[2] Balendra SI, Normando EM, Bloom PA, et al. Advances in retinal ganglion cell imaging [J]. *Eye (Lond)*, 2015, 29 (10) : 1260-1269. DOI: 10.1038/eye.2015.154.

[3] Liu X, Zuo Z, Liu W, et al. Upregulation of Nogo receptor expression induces apoptosis of retinal ganglion cells in diabetic rats [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9 (8) : 815-820. DOI: 10.4103/1673-5374.131597.

[4] Chao JR, Knight K, Engel AL, et al. Human retinal pigment epithelial cells prefer proline as a nutrient and transport metabolic intermediates to the retinal side [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292 (31) : 12895-12905. DOI: 10.1074/jbc.M117.788422.

[5] Kim YH, Kim YS, Kang SS, et al. Resveratrol inhibits neuronal apoptosis and elevated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity in diabetic mouse retina [J]. *Diabetes*, 2010, 59 (7) : 1825-1835. DOI: 10.2337/db09-1431.

[6] Al-Hussaini H, Kilarkaje N. Effects of trans-resveratrol on type 1 diabetes-induced inhibition of retinoic acid metabolism pathway in retinal pigment epithelium of Dark Agouti rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 834 : 142-151. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.07.028.

[7] 李青春, 邢怡桥, 李岱. 白藜芦醇对糖尿病大鼠视网膜 bcl-2 和 bax 表达的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34 (8) : 1223-1226. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2018.08.001.

Li QC, Xing YQ, Li D. Effect of resveratrol on the expression of bcl-2 and bax in the retina of diabetic rats [J]. *J Prac Med*, 2018, 34 (8) : 1223-1226. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2018.08.001.

[8] Wang DD, Zhu HZ, Li SW, et al. Crude saponins of panax notoginseng have neuroprotective effects to inhibit palmitate-triggered endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and loss of postsynaptic proteins in staurosporine differentiated RGC-5 retinal ganglion cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64 (7) : 1528-1539. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05864.

[9] Beros J, Rodger J, Harvey AR. Developmental retinal ganglion cell death and retinotopicity of the murine retinocollicular projection [J]. *Dev Neurobiol*, 2018, 78 (1) : 51-60. DOI: 10.1002/dneu.22559.

[10] 杨慧慧, 阚全娥, 于璐, 等. 小干扰 RNA-TLR9 对高糖下大鼠视网膜神经节细胞凋亡的抑制作用及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38 (1) : 38-44. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.10.008.

Yang HH, Kan QE, Yu L, et al. Inhibitory effect of small interfering RNA-TLR9 on high glucose-induced retinal ganglion cell apoptosis [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38 (1) : 38-44. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2019.10.008.

[11] Barnstable CJ, Reddy R, Li H, et al. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) regulates retinal ganglion cell number and survival [J]. *J Mol Neurosci*, 2016, 58 (4) : 461-469. DOI: 10.1007/s12031-016-0728-5.

[12] Bola C, Bartlett H, Eperjesi F. Resveratrol and the eye: activity and molecular mechanisms [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2014, 252 (5) : 699-713. DOI: 10.1007/s00417-014-2604-8.

[13] 陆冰, 孙晓东. 坏死性凋亡与视网膜细胞死亡相关性的研究进展 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2016, 34 (1) : 85-88. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.01.018.

Lu B, Sun XD. Research advancement on necroptosis in retinal cell death [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2016, 34 (1) : 85-88. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2016.01.018.

[14] Molins B, Pascual A, Méndez, et al. C-reactive protein isoforms differentially affect outer blood-retinal barrier integrity and function [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 312 (3) : C244-244C253. DOI: 10.1152/ajpcell.00057.2016.

[15] Elmasry K, Mohamed R, Sharma I, et al. Epigenetic modifications in hyperhomocysteinemia: potential role in diabetic retinopathy and age-related macular degeneration [J]. *Oncotarget*, 2018, 9 (16) : 12562-12590. DOI: 10.18632/oncotarget.24333.

[16] Alipour M, Adineh F, Mosatafavi H, et al. Effect of chronic intraperitoneal aminoguanidine on memory and expression of bcl-2 family genes in diabetic rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94 (6) : 669-675. DOI: 10.1139/cjpp-2015-0357.

[17] Zhu L, Hao J, Cheng M, et al. Hyperglycemia-induced bcl-2/bax-mediated apoptosis of Schwann cells via mTORC1/S6K1 inhibition in diabetic peripheral neuropathy [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 367 (2) : 186-195. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.03.034.

(收稿日期: 2020-05-19 修回日期: 2020-08-30)

(本文编辑: 张宇 骆世平)